

⑨Int. Cl. ⑩日本分類
O 07 d 16 E 64
A 61 k 30 B 22

日本国特許庁

⑪特許出願公告

昭45-38059

⑩特許公報

⑫公告 昭和45年(1970)12月 2日

発明の数 1

(全3頁)

1

⑬補酵素型ビタミンB₁₂の製造法

⑭特 願 昭42-47889

⑮出 願 昭42(1967)7月27日

⑯発 明 者 遠田 稔

横浜市港北区南綱島町408

同

桑名 徳明

東京都練馬区東大泉町74

⑰出 願 人 エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4の6の10

代 表 者 内藤 祐次

発明の詳細な説明

本発明はシアノコバラミンから出発して、補酵素型ビタミンB₁₂を製造する方法に関するものである。

従来おこなわれている補酵素型ビタミンB₁₂の製造法は、主として、ハイドロキソコバラミンをナトリウム・ボロ・ハイドライド、亜鉛-酢酸、又はクロマウス・アセテート(pH 9.5)で還元するか(以上英国特許第968378号)又は亜鉛-10%塩化アンモン水溶液中で還元するか(ベルギー特許第631589号)してB₁₂とし、これを2'-8'-イソプロピリデン-5'-アトシルアデノシン等を添加することによりなされている。

ここで、ハイドロキソコバラミンは、通常シアノコバラミンを亜鉛-塩酸等でB₁₂、又はB₁₂まで還元し生じたシアノイオンをシアニ化水素として加温減圧下で除去し、次いで通気して酸化することにより得られているが、市価ではシアノコバラミンの約2倍高価になっている。

従って、直接シアノコバラミンから補酵素型ビタミンB₁₂を製造する方が経済的にも操作の煩雑さの点からも有利である。

しかし周知の如く、補酵素型ビタミンB₁₂をはじめビタミンB₁₂類縁化合物は、一般にシアノイオンに極めて感受性が高いため、シアノコバラミ

2

ンを出発原料として用いた場合は、還元の際生ずるシアノイオンを完全に除去し得ないと、残ったシアノイオンが生成した補酵素型ビタミンB₁₂と反応して容易にシアノコバラミンに戻るため、収率の低下及び精製操作の煩雑をきたす。

従来はこのシアノイオンの除去に対し、何ら特別の考慮が払われていなかった。

本発明者は、この点に着目して種々研究をかさねた結果、シアノコバラミンを出発原料としこれを還元し、生じたシアノイオンを鉄イオンで除去して、直接補酵素型ビタミンB₁₂にする製造法を見出した。

すなわち、本発明は微酸性(pH 6.2以上)からアルカリ性の条件下で、シアノコバラミンをアルカリ金属・ボロ・ハイドライド等の還元剤で還元し、生じたシアノイオンを2価及び8価の鉄イオンを加えて捕捉沈殿をさせ、次いで5'-アトシルアデノシン等を加えることにより、補酵素型ビタミンB₁₂を製造するものである。

ここで特に重要なことは、鉄イオンとシアノイオンとはpH 6.2からアルカリ性のpH領域に於いて、鉄シアノ錯塩の沈殿を生じ、酸性領域では生じない為、本発明の実施にあたっては、微酸性からアルカリ性にpHを調整しておくことである。

又鉄シアノ錯塩として沈殿を生じさせる為には、2価鉄イオンの他に3価鉄イオンの存在も必要であるが、一般に2価鉄イオン水溶液はそのまゝの状態で酸化され、容易に3価鉄イオンに変わるので8価鉄イオンを加えなくても鉄シアノ錯塩の沈殿生成は進行する。

しかし、本発明の実施にあたっては2価鉄イオン水溶液の調整時に微量の3価鉄イオンを加える方が好結果を得る場合が多い。

この場合の鉄イオンの必要量はシアノイオンがフェロシアン鉄又はフェリシアン鉄として完全に捕捉されると仮定した場合の3~5倍量が最も適当であり、これより少ない場合はシアノイオンの

3

捕捉が不完全となり、多い場合は、5'-アデノシン等と B_{12} との反応を阻害し、収率の低下をきたすことになる。

次に本発明の一般的方法を示すと次の如くである。

すなわち、シアノコバラミンを水、又はメチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール等の低級アルコールの含水溶液に溶解し、これにアルカリ金属・ボロ・ハイドライド例えばナトリウム・ボロ・ハイドライド、リチウム・ボロ・ハイドライド等のアルコール溶液を窒素気流下に添加して、 B_{12} を還元した後、2価の鉄水溶液、例えば硫酸第1鉄7水和物($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)モール塩[(NH_4)₂ $SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$]の水溶液、もしくはこれら2価鉄水溶液に、塩化第2鉄6水和物($FeCl_2 \cdot 6H_2O$)等の8価鉄水溶液を加え、脱気し窒素ガス置換をしたものを、酸素不存下に添加し、生成したシアノイオンを鉄シアノ錯塩として沈殿させ、数分後に、赤色光線下、又は微弱光線下にて、一般式RX(Rは5'-デオキシリボリンヌクレオシド、5'-デオキシピリミジンヌクレオシド、及びそれらの糖部の2'-8'-一位をイソプロピリデン、ベンジリデン又はアセチル基で保護したヌクレオシド類、或はアルキル基、アラルキル基、Xはハロゲン即ちクロル、ブロムヨード、又はアルキル、アリル、アラルキルのスルホン酸基、例えばメチルスルホン酸基又はp-トルエンスルホン酸基等)で示される化合物をビリジン又はメタノール・エタノール、プロピルアルコールの様な適当な水溶性溶媒にとかした溶液を添加して、補酵素型ビタミン B_{12} 類縁化合物を80~90%の高収率で得る。

ここで、真の補酵素型ビタミン B_{12} といわれる5'-デオキシシアデノシルコバラミンを製造する場合、従来用いられている2'-8'-イソプロピリデン-5'-アデノシンを使用するとイソプロピリデン基をはずすために加水分解する必要がある。加水分解操作をおこなった場合生成物たる5'-デオキシシアデノシルコバラミン以外に異常生成物を与えるため、この分離精製操作に煩雑をきたす。

しかし、5'-アデノシンを用いれば前記の如く加水分解を行う必要がないため操作も簡便となるので本発明の実施にあたっては5'-

4

アデノシンを用いる方が良い。

又反応中に生ずる鉄シアノ錯塩及び過剰の鉄イオンは、全反応終了後、空気を反応液に通じ過剰の2価鉄イオンを水酸化第2鉄として沈殿させた後、少量のセライト等の伊過補助剤層を通して濾過を行うか遠心分離により除去する。なお、本発明の実施にあたり、2価および8価の鉄イオンを加えない場合の収率はよくても40~50%にとどまる。

反応終了後の補酵素型ビタミン B_{12} の抽出・精製は、従来用いられている方法によつて行なう。

即ち、反応終了後、鉄化合物を上記の如くして除去した濾液を希酸で中和し、中和液をフェノールで抽出後、フェノール層を約5倍量のエーテル及び少量の水で振盪し、水層に転溶させる。

なおイソプロピリデン、又はベンジリデン等の保護基を糖部につけたヌクレオシドを用いた場合は、適当な条件下で保護基をはずし、再度同様な抽出、精製操作を行なつて生成物を濃縮する。

更に必要に応じて、以下の如き精製を行う。すなわち、イオン交換体、例えばカルボキシ・メチル・セルロース、陽イオン交換体、クワンタックス50W(登録商標)等を使用したクロマトグラフィにより分離精製をおこない、補酵素型ビタミン B_{12} を単離、続いてフェノール抽出、エーテル添加、水転溶により濃縮し、アセトン、テトラヒドロフラン等の様な水溶性溶媒を加えて結晶化するか、又は濃縮水溶液を凍結乾燥することにより目的の補酵素型ビタミン B_{12} を純粋な結晶又は粉末として取り出す。

なお、周知の如く補酵素型ビタミン B_{12} 類縁化合物は、白色光線により極めて分解され易いが550m μ 以上の赤色光線下では安定であるので、補酵素型ビタミン B_{12} の生成工程及びその後の抽出、精製操作はすべて赤色光線下、又は微弱光線下で行う必要がある。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例 1

シアノコバラミンから5'-デオキシシアデノシルコバラミンの製造

シアノコバラミン500mgを蒸留水40mlに溶解し窒素ガスを通じながら容器内の酸素を窒素で置換した後、ナトリウム・ボロ・ハイドライド120mg含有エタノール溶液20mlを加え15分間攪拌下還元を行なつた。反応液は赤色か

ら灰黒色に変化した。次いで硫酸第1鉄7水和物 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 170 mg 含有水溶液 1.7 mℓ を攪拌下に加え、2~3分後に、赤色光線下で5'-オートシル-アデノシン 480 mg 含有のメタノール：水：グリセリン (2:1:1) 溶液 20 mℓ を加え、更に45分間攪拌を継続した。

反応後、窒素ガスを止め、20分間溶液中に空気を通じた後、セライト 4~5 mm の層を通過させて鉄化合物を濾去した。

セライト層は水洗後、洗液を濾液に合わせ希塩酸で中和した後、常法に従つて、フェノール抽出し、フェノール層をよく水洗後、エーテルを5倍量加え、少量の水で、ビタミン B_{12} 化合物を抽出した。その抽出液を更に少量のエーテルで洗滌してフェノールを除去した後、ダウエックス 50 W (登録商標)-X2 でシアノコバラミン、補酵素型ビタミン B_{12} 、及びハイドロキソコバラミンに分離精製し、補酵素型ビタミン B_{12} 含有区分 (pH 6.2 流出区分) をフェノールで精製して、約 10 mℓ 水溶液にまで濃縮した。

この濃縮液にアセトンアセトン含量約 90% まで加えて、冷蔵庫内に2昼夜放置した。この間に析出した結晶を遠心分離により集め、乾燥結晶 420 mg (収率 72.8%) を得た。

この結晶は電気泳動 (pH 8.5) 及び水飽和 Sec-ブチルアルコールのペーパークロマトグラフィーで単一スポットを与え、紫外及び可視吸収スペクトルは、極大吸収値 pH 2.0 で 263 mμ, 284 mμ, 308 mμ, および 458 mμ, pH 7.0 で 260 mμ, 315 mμ, 340 mμ, 375 mμ, および 522 mμ を示し、5'-デオキシシアデノシルコバラミン標品の極大吸収値に一致した。

なお、硫酸第1鉄無添加の比較実験に於ては目的物 288 mg (収率 41%) を得たに過ぎなかつた。

実施例 2

シアノコバラミンから5'-デオキシシアデノシルコバラミンの製造

シアノコバラミン 1 g を蒸留水 80 mℓ に溶解し、窒素気流下ナトリウム・ボロ・ハイドライド

250 mg 含有エタノール溶液 40 mℓ を加え、15分間攪拌下還元を行なつた。反応液が灰黒色となつた後、モル塩 $[\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 145 mg 及び塩化第2鉄6水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 180 mg 含有水溶液 5 mℓ を加え、1~2分後5'-オートシル-アデノシン 860 mg 含有乾燥ピリジン溶液 8 mℓ を加えて、45分間攪拌を継続した。以下実施例1に準じて精製操作を行い、5'-デオキシシアデノシルコバラミン 850 mg (収率 78%) を得た。

実施例 3

シアノコバラミンからメチルコバラミンの製造
シアノコバラミン 100 mg を蒸留水 10 mℓ にとかし、その水溶液 10 mℓ を入れた反応容器を窒素ガスで置換した後、攪拌下、ナトリウム・ボロ・ハイドライド 2.5 mg 含有のエタノール溶液 10 mℓ を加え、15分間攪拌下還元した。

反応液が灰黒色になつてから、硫酸第1鉄7水和物 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 25 mg 含有水溶液 0.25 mℓ を加えた。約2分後にヨードメチル 0.1 mℓ / mℓ 含有メチルアルコール溶液 5 mℓ を加え、45分間攪拌を継続した後、沈殿せる鉄化合物を濾去し、実施例1の方法に準じてフェノール精製濃縮を行なつてメチルコバラミン 90 mg (収率 90.5%) を得た。

このものの極大吸収値は pH 2.0 で 375 mμ、及び 460 mμ, pH 7.0 で 375 mμ、及び 522 mμ で文献値と一致した。

なお、硫酸第1鉄無添加の比較実験に於てはシアノコバラミンの残存は、電気泳動、ペーパークロマトグラフィー、及び可視吸収スペクトルで明白であり、その取得量も 64 mg (収率 64.5%) に過ぎなかつた。

特許請求の範囲

1 補酵素型ビタミン B_{12} の製造法において、微酸性 (pH 6.2) からアルカリ性の条件下で、シアノコバラミンを B_{12} まで還元し、生じたシアノイオンを2価及び8価鉄イオンで沈殿除去することを特徴とする補酵素型ビタミン B_{12} の製造法。